

REC'D 15 NOV 2000

WIPO

PCT

PCT/JP 00/06347
26.10.00

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JPO00/6347

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1999年 9月21日

出 願 番 号
Application Number:

平成11年特許願第267024号

出 願 人
Applicant (s):

森下 竜一
住友製薬株式会社

4

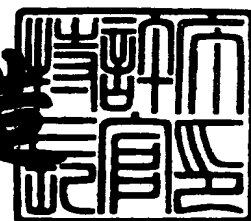
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月13日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3084228

【書類名】 特許願
 【整理番号】 132633
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 A61K 48/00
 A61K 38/18

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区宮原 2-11-22-502

【氏名】 森下 竜一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市桜ヶ丘 2-7-29

【氏名】 荻原 俊男

【特許出願人】

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区宮原 2-11-22-502

【氏名又は名称】 森下 竜一

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代表者】 横塚 實亮

【代理人】

【識別番号】 100107629

【弁理士】

【氏名又は名称】 中村 敏夫

【電話番号】 06-6466-5214

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脳血管障害のための新規な遺伝子治療

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 HGF 遺伝子及び／又は VEGF 遺伝子を有効成分として含有する、脳血管障害の治療又は予防剤。

【請求項 2】 ~~脳血管障害が、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症である、請求項 1 記載の治療又は予防剤。~~

【請求項 3】 HGF 遺伝子及び／又は VEGF 遺伝子を有効成分として含有する、脳の血流量低下の治療又は予防剤。

【請求項 4】 HGF 遺伝子及び／又は VEGF 遺伝子を有効成分として含有する、脳の血管新生促進剤。

【請求項 5】 HGF タンパクを併用することを特徴とする、請求項 1～4 いずれか記載の剤。

【請求項 6】 HGF 遺伝子及び／又は VEGF 遺伝子を HVJ-リポソームの形態で投与することを特徴とする、請求項 1～5 いずれか記載の剤。

【請求項 7】 クモ膜下腔へ投与することを特徴とする、請求項 1～6 いずれか記載の剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、脳血管障害を治療又は予防するための新規な遺伝子治療剤、および当該遺伝子治療剤の新規な投与方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、HGF（肝実質細胞増殖因子）遺伝子及び／又は VEGF（血管内皮増殖因子）遺伝子を有効成分として含有する脳血管障害の治療又は予防剤、あるいは当該治療又は予防剤をクモ膜下腔に投与することを特徴とする新規な投与方法などに関する。

【0002】

【従来の技術】

脳動脈のアテローム性動脈硬化症によって引き起こされる脳閉塞性疾患、もやもや病等はしばしば脳の慢性的な血流量低下を引き起こす。この状態から、その後の脳虚血性事象だけでなく痴呆を含む神経病理学的変化に至ることがある (Stroke 25,1022-1027、Stroke 29,1058-1062(1998)、Stroke 24,259-264(1993)、Ann.N.Y.Acad.Sci.695,190-193(1993))。しかし、これらの脳血管性障害における血流量低下を改善する有効な治療法は未だ確立されていない。虚血性発作においては、特に虚血周辺部で活発な血管新生を生じさせることが知られており、そしてこれはヒトのより長期の生存に関与している (Stroke 25,1794-1798(1994))。それ故血管新生は、脳虚血症の回復や将来の発作予防において重要な役割を果たすと考えられている。

【0003】

新しい血管の発生や血管新生は親血管の内皮細胞の活性化と共に開始されるが、インビボでこの血管新生を刺激するだけでなく、インビトロで内皮細胞に対してマイトジェニックであることが示されている増殖因子を「血管新生増殖因子」と称している。

血管新生増殖因子の治療的な関与は、Folksmanらによって最初に文献発表された (N.Engl.J.Med.285,1182-1186(1971))。またその後の研究によって、組換え血管新生因子、例えば繊維芽細胞増殖因子 (FGF) ファミリー (Science 257,1401-1403(1992)、Nature 362,844-846(1993))、内皮細胞増殖因子 (J.Surg.Res.54,575-583(1993))、及び血管内皮増殖因子 (VEGF) などを使用して心筋及び後肢虚血症の動物モデルにおける側副血行路の発達を促進及び／又は増進させ得ることが確認されている (Circulation 90,II-228-II-234(1994))。さらに本発明者らは、HGFがVEGFと同様に内皮特異的増殖因子として作用することを見出している (J.Hypertens.14,1067-1072(1996))。

血管障害を治療するために前記の如き血管新生増殖因子を用いる戦略は、「治療的血管新生」と称されている。より最近では、この戦略はヒトの虚血性疾患に適用されている。しかしながら、脳虚血症に対してもこの戦略が有効であるかどうかは、今日までのところ知られていない。

【0004】

肝細胞増殖因子 (HGF) は、多様な細胞に対して分裂誘発活性、運動性促進活性及び形態形成活性を示すプレイオトロフィックなサイトカインである (Nature 342,440-443(1989))。

HGFの脳における作用については、以下のような報告がなされている。すなわち、HGFと膜貫通型チロシンキナーゼの c-Met/HGFレセプターは共に脳の種々の領域で発現しており、HGFとc-Met間の機能的な結合によって初代培養海馬のニューロンの生存が高められることや、インビトロでのニューロン発達において神経突起の伸長の誘導されることが知られている (J.Cell.Biol.126,485-494(1994)、特開平7-89869号公報)。最近、HGFが虚血中のニューロン内で誘導されることが報告されており (Brain Res.799,311-316(1998))、また組換えHGFが海馬における虚血後の遅延性神経細胞死に対して神経保護効果を有していることや、HGFを脳内に連続的に注入することにより梗塞の大きさの減少に有効であったことが報告されている (J.Cereb.Blood Flow Metab. 18,345-348(1998)。これらの知見から、HGFは脳虚血中の重要な神経栄養因子として作用するものと考えられる。

【0005】

他方、血管内皮増殖因子 (VEGF) は、内皮細胞に対してマイトジェニックな二量体糖タンパク質であり、そして血管透過性を高める能力を有している。VEGFは内皮細胞に対して直接的且つ特異的なマイトジェニックな効果を有している (Biochem.Biophys.Res.Comm.,161,851-858 (1989))。チロシンキナーゼレセプターFlt、Flk-1及びKDRを含むVEGFの結合部位は、他のタイプの細胞ではなく内皮細胞上に存在しているため、VEGFの効果は内皮細胞に限定されている。

【0006】

VEGFの脳における作用に関しては、中枢神経系においてVEGFは虚血性障害によって脳内に急速に誘導されることが報告されており (Mol.Cell.Biol.,16,4604-4613(1996))、また組換えVEGFの脳表面への投与が、梗塞量の減少に有効であったことが報告されている (J.Cereb.Blood Flow Metab.18,887-895(1998))。しかし詳しいことは分かっていない。

【0007】

以上のようなHGFおよびVEGFの作用の他、別の観点からは、前述の如くこれらの因子は強力な血管新生増殖因子である (J.Cell.Biol.119,629-641(1992)、Biochem.Biophys.Res.Comm.161,851-858(1989))。虚血性発作は、特に虚血周辺部で活発な血管新生を生じさせることが知られており、そしてこれはヒトのより長期の生存と関係している (~~Stroke 25,1794-1798(1994)~~)。それ故、血管新生は脳虚血症の回復や将来の発作予防で重要な役割を果たすと考えられる。しかしながら、脳虚血症等に対して組換えHGFやVEGFが適用できるかどうかについては知られていない。さらに、組換え血管新生増殖因子は急速に消失するので脳内に連続的に注入しなければならず、そしてこの操作は臨床状況下ではかなり危険である。それ故、遺伝子導入技術を適用して虚血性の脳内や周辺で血管新生増殖因子を発現及び分泌できれば合理的であると考えられる。しかしHGF遺伝子やVEGF遺伝子の脳虚血性障害への適用については、脳という組織の特殊性を反映してか、現在までのところ何ら知られていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、脳血管障害を治療又は予防するための新規な遺伝子治療剤、および当該遺伝子治療剤の新規な投与方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、HGF（肝実質細胞増殖因子）遺伝子及び／又はVEGF（血管内皮増殖因子）遺伝子を有効成分として含有する脳血管障害の治療又は予防剤、あるいは当該治療又は予防剤をクモ膜下腔に投与することを特徴とする新規な投与方法などに関する。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、HGF及びVEGFの遺伝子導入によって、虚血状態の脳表面に血管新生を誘導することができるかどうかを検討した。その結果、(a) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクション後、長期間にわたってこれらのタンパク質が脳内で検出されること、(b) HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクションによる治療法により虚血状態の脳表面に血管新生を誘導で

きること、(c) HGF 遺伝子又は VEGF 遺伝子のトランスフェクションが血管の閉塞によって引き起こされる脳の血流量低下を治療するのに有効であること、そして(d)この治療法は、閉塞前に実施したときも有効であることを明らかにした。更に、これらの遺伝子導入はクモ膜下腔への導入という新しい投与法により効率的に達成されることも明らかにした。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

【0010】

すなわち本発明は、

- (1) HGF 遺伝子及び／又は VEGF 遺伝子を有効成分として含有する、脳血管障害の治療又は予防剤、
- (2) 脳血管障害が、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症である、前記(1)記載の治療又は予防剤、
- (3) HGF 遺伝子及び／又は VEGF 遺伝子を有効成分として含有する、脳の血流量低下の治療又は予防剤、
- (4) HGF 遺伝子及び／又は VEGF 遺伝子を有効成分として含有する、脳の血管新生促進剤、
- (5) HGF タンパクを併用することを特徴とする、前記(1)～(4)いずれか記載の剤、
- (6) HGF 遺伝子及び／又は VEGF 遺伝子を HVJ-リボソームの形態で投与することを特徴とする、前記(1)～(5)いずれか記載の剤、ならびに
- (7) クモ膜下腔へ投与することを特徴とする、前記(1)～(6)いずれか記載の剤、に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明において使用される「HGF 遺伝子」とは、HGF (HGF タンパク) を発現可能な遺伝子を指す。具体的には、Nature, 342, 440 (1989)、特許第 277767 8 号公報、Bi chem. Biophys. Res. Commun., 163, 967 (1989) などに記載の HGF の cDNA を後述の如き適当な発現ベクター (非ウイルスベクター、ウイルスベクタ

一) に組み込んだものが挙げられる。ここで HGF・cDNA の塩基配列は、前記文献に記載されている他、Genbank 等のデータベースにも登録されている。従ってこれらの配列情報に基づき適当な DNA 部分をハイブリダイゼーションのプロブ又は PCR のプライマーとし、例えば肝臓や白血球由来の cDNA ライブラリー等を用いることにより、HGF の cDNA をクローニングすることができる。これらのクローニングは、例えば Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。

【0012】

さらに、本発明の HGF 遺伝子は前述のものに限定されず、発現されるタンパク質が HGF と実質的に同じ作用を有する遺伝子である限り、本発明の HGF 遺伝子として使用できる。すなわち、1) 前記 cDNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA や、2) 前記 cDNA によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列に対して 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする DNA、などのうち、HGF としての作用を有するタンパクをコードするものであれば、本発明の HGF 遺伝子の範疇に含まれる。ここで前記 1) 及び 2) の DNA は、例えば部位特異的突然変異誘発法、PCR 法、又は通常のハイブリダイゼーション法などにより容易に得ることができ、具体的には前記 Molecular Cloning 等の基本書を参考にして行うことができる。

【0013】

発明において使用される「VEGF 遺伝子」とは、VEGF (VEGF タンパク) を発現可能な遺伝子を指す。すなわち、VEGF の cDNA を後述の如き適当な発現ベクター (非ウイルスベクター、ウイルスベクター) に組み込んだものが例示される。VEGF 遺伝子は、ヒトにおいては転写に際しての選択的スプライシングにより、4 種類のサブタイプ (VEGF121、VEGF165、VEGF189、VEGF206) の存在が報告されている (Science, 219, 983 (1983)、J. Clin. Invest., 84, 1470 (1989)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 161, 851 (1989))。本発明においてはこれらのいずれの VEGF 遺伝子をも使用することが可能であるが、生物学的に最も活性

が強いという観点から、VEGF165遺伝子がより好ましい。さらに前記のHGFの場合と同様に、これらVEGFの遺伝子に対して改変等を施した遺伝子であっても、VEGFとしての作用を有するタンパクをコードする遺伝子である限り、本発明のVEGF遺伝子の範疇に含まれる。

【0014】

当該VEGF遺伝子もHGF遺伝子と同様に、文献（例えばScience, 246, 1306 (1989)）記載の配列及びデータベースに登録されている配列情報に基づき、当業者ならば容易にクローニングすることができ、またその改変等も容易に行うことができる。

【0015】

本発明においては、HGF遺伝子又はVEGF遺伝子により、脳血管障害が治療又は予防されることを初めて明らかにしたものである。すなわち本発明において初めて、（a）HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクション後、長期間にわたってこれらのタンパク質が脳内で検出されること、（b）HGF遺伝子又はVEGF遺伝子トランスフェクションによる治療法により虚血状態の脳表面に血管新生を誘導できること、（c）HGF遺伝子又はVEGF遺伝子のトランスフェクションが血管の閉塞によって引き起こされる脳の血流量低下を治療するのに有効であること、そして（d）この治療法は、閉塞前に実施したときも有効であることを明らかにした。従ってHGF遺伝子及びVEGF遺伝子は、脳虚血に起因する障害、脳の血流量低下を伴う障害、脳の血管新生を促進することにより改善が期待される障害等の、種々の脳血管障害に対する治療又は予防剤として、有効に使用される。

【0016】

具体的には、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆、脳出血後遺症又は脳梗塞後遺症などの治療または予防剤として有効に使用される（以下、本発明の治療又は予防剤を単に遺伝子治療剤と称することもある）。

【0017】

本発明においては、HGF遺伝子、VEGF遺伝子各々単独で用いることもで

されば、両者を併用して使用することも可能である。また、他の血管内皮増殖因子の遺伝子と共に用いることもできる。さらに、HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子と、HGFタンパク及び／又はVEGFタンパクとを併用することも可能である。好ましくはHGF遺伝子とHGFタンパクとの組み合わせであり、これに関しては後述の実施例4を参照されたい。

【0018】

なお、ここで用いるHGFタンパクとしては、医薬として使用できる程度に精製されたものであれば如何なる方法で調製されたものでも良く、また市販品（例えば東洋紡績株式会社、Code No.HGF-101等）を使用することもできる。前記クローニングにより得られたHGFのcDNAを適当な発現ベクターに挿入し、これを宿主細胞に導入して形質転換体を得、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFタンパクを得ることができる（例えばNATURE, 342, 440 (1989)、特許第2777678号等参照）。

【0019】

次に、本発明の遺伝子治療において用いられる遺伝子導入方法、導入形態および導入量等について記述する。

【0020】

前記遺伝子を有効成分とする遺伝子治療剤を患者に投与する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の二つに大別され、実験手引書などにその調製法、投与法が詳しく解説されている（別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社、1996、別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社、1997）。以下、具体的に説明する。

【0021】

A. 非ウイルスベクターを用いる場合

遺伝子発現ベクターに本発明のDNAを組み込み、リン酸-カルシウム共沈法、リボソームを用いてDNA分子を導入する方法（リボソーム法、HVJ-リボソーム法、カチオニックリボソーム法、リポフェクチン法、リポフェクトアミン法）、DNA直接注射法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃（Gene Gun）で担体（金属粒子）とともにDNA分子を細胞に移

入する方法等の何れかの方法により組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。ここで用いられる発現ベクターとしては、例えば pCAGGS (Gene 108,193-200(1991)) や、pBK-CMV、pCDNA3.1、pZeoS (インビトロゲン社、ストラタジーン社) などの発現ベクターが挙げられる。

【0022】

このうちHVJ-リポソームは、脂質二重膜で作られたリポソーム中にDNAを封入し、さらにこのリポソームと不活化したセンダイウイルス (Hemagglutinating virus of Japan : HVJ) とを融合させたものである。当該HVJ-リポソーム法は従来のリポソーム法と比較して、細胞膜との融合活性が非常に高いことを特徴とするものであり、好ましい導入形態である。HVJ-リポソームの調製法については文献 (実験医学別冊, 遺伝子治療の基礎技術, 羊土社, 1996、遺伝子導入&発現解析実験法, 羊土社, 1997、J.Clin.Invest.93,1458-1464(1994)、Am.J.Physiol.271,R1212-1220(1996)) などに詳しく述べられており、また後述の実施例にも詳しく記載されているため、それらを参照されたい。なおHVJとしてはZ株 (ATCCより入手可能) が好ましいが、基本的には他のHVJ株 (例えば ATCC VR-907や ATCC VR-105など) も用いることができる。

【0023】

B. ウイルスベクターを用いる場合

ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス (HIV) 等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

前記ウイルスベクターの内、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

【0024】

本発明の遺伝子治療剤の導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入する *in vivo* 法、及びヒトからある種の細胞を取り出して体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36（1）、23-48（1994）、実験医学増刊、12（15）、（1994））。本発明では、*in vivo* 法が好ましい。

【0025】

患者への投与部位としては、治療目的の疾患、症状などに応じた適当な投与部位が選択される。例えば、従来より試みられている遺伝子導入法である頭蓋内へ直接穴を開けて遺伝子を導入する方法の他、側脳室への投与、あるいはクモ膜下腔への投与などが挙げられる。このうちクモ膜下腔への投与は、本発明において開示された新規かつ効率的な投与方法であり、本発明の目的、すなわち脳の血流量低下を血管新生で治療しようとする際には、クモ膜下腔への投与が好ましい。

【0026】

製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態（例えば液剤など）をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含有する注射剤とされた場合、当該注射剤は常法により調製することができ、例えば適切な溶剤（PBS等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等）に溶解した後、フィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。当該注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、HVJ-リポソーム等のリポソームにおいては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができる。

また、疾患部位の周囲に遺伝子を存在し易くするために、徐放性の製剤（ミニペレット製剤等）を調製し患部近くに埋め込むことも可能であり、あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することも可能である。

【0027】

製剤中のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常、本発明のDNAとして0.0001-100mg

、好ましくは0.001-10mgであり、これを数日ないし数ヶ月に1回投与するのが好ましい。

【0028】

【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0029】

材料及び実験方法

1. 両側頸動脈の結紮

雄スプラーグ・ドゥリーラット (350~400g; Charles River Japan、日本国厚木市) をペントバルビタールナトリウム (50mg/kg、腹腔内) で麻酔し、そして外科手術の間中自然呼吸させた。頸部中線切開によって、両側頸動脈を露出させ、そして2-0シルクで堅く結紮した。

【0030】

2. HVJ-リポソームコンプレックスの調製

HVJ-リポソームを調製するために使用した方法は文献 (J.Clin.Invest.93,1458-1464(1994)、Am.J.Physiol.271,R1212-1220(1996)) に記載されているとおりである。簡単に述べると、ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン及びコレステロールを1:4.8:2の重量比で混合した。この脂質混合物 (10mg) はロータリーエバポレーター内でテトラヒドロフランを除去してフラスコの側面に沈着させた。乾燥した脂質は、目的遺伝子の挿入された発現ベクターを有する200 μ lの平衡塩類溶液 (BSS; 137 μ M NaCl、5.4 μ M KCl、10 μ M トリス-HCl、pH 7.6) 中で水和させた。対照群のリポソームは、目的遺伝子の挿入のない発現ベクターを含有している (BSS 200 μ l)。振とう及び超音波処理によってリポソームを調製した。

【0031】

精製HVJ (Z株) は、使用直前に3分間UV照射 (1秒当たり110エルグ/mm²) して不活性化した。リポソーム懸濁液 (0.5ml、10mgの脂質を含有する) をHVJ (総容量4mlのBSS中10,000血球凝集単位) と混合した。この混合物を4

℃で5分間、そしてその後静かに振とうしながら37℃で30分間インキュベートした。フリーのHVJはショ糖密度勾配遠心によってHVJ-リボソームから除去した。ショ糖勾配の頂部層を集めて使用した。プラスミドDNAの最終濃度は、以前の報告 (J.Clin.Invest.93,1458-1464(1994)、Am.J.Physiol.271,R1212-1220(1996)) に従って計算したとき、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ と同等であった。この調製方法は、最大のトランスフェクション効率を達成するように最適化されている。

【0032】

3. インビボ遺伝子導入

インビボでの効率的な遺伝子導入法を確立するために、我々はHVJ-リボソームとコンプレックスを形成したプラスミドを送達する3つの異なる方法; 1) 内頸動脈への直接注入、2) 側脳室への注入、及び3) 大槽 (クモ膜下腔) への注入を試験した。

【0033】

内頸動脈への注入では、雄スプラーグ・ドゥリーラット (350~400 g) をペントバルビタールナトリウム (50mg/kg、腹腔内) で麻酔し、そして左総頸動脈まで切開してポリエチレンカテーテル (PE-50、Clay Adams、ニュージャージー州パーシッパニー) を左外頸動脈に導入した (Rakugi等)。遠位外頸動脈区域は一時的結紮糸で短時間隔離した。HVJ-リボソームコンプレックス (1 ml) を外頸動脈区域に注入した。注入後注入カニューレを除去し、そして結紮糸を緩めて総頸動脈への血流を回復させた。

【0034】

側脳室への注入では、麻酔したラットを定位固定枠 (Narishige Scientific Instrument Laboratory、日本国東京都) に置き、そして頭蓋を露出させた。特別に設計したテフロン連結器 (FEP管、Bioanalytical Systems、インディアナ州ウェストラファイアット) を有するステンレス鋼カニューレ (30ゲージ; Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレイクス) を、文献 (Am.J.Physiol.271,R1212-1220 (1996)) に記載されているようにして左側脳室に導入した。定位固定座標は次のとおりであった。: プレグマの後ろ1.3mm、中線の側方2.1mm、及び頭蓋表面の下3.6mm。HVJ-リボソームコンプレックスを側脳

室に注入した ($20\mu\text{l}$)。HVJ-リボソームコンプレックスを注入した後、注入カニューレを除去した。四肢の痙攣又は異常運動のような挙動変化は、注入を受けたどの動物でも観察されなかった。

【0035】

クモ膜下腔への注入では、各動物の頭部を臥位に固定し、そして後頭骨頸中線切開によって環椎後頭膜を露出させた。ステンレス鋼カニューレ (27ゲージ; Becton Dickinson、ニュージャージー州フランクリンレイクス) を大槽に導入した。カニューレの位置を確認しそして脳内圧の上昇を回避するために $100\mu\text{l}$ の脳脊髄液を除去した後に、HVJ-リボソーム溶液 ($100\mu\text{l}$: $100\mu\text{g/ml}$) を大槽 (クモ膜下腔) に 1 分以上かけて注意深く注入した。その後、動物は 30 分間頭部を下にして置いた。予防的投与量の抗生物質 (30,000U のペニシリン G) を投与して無菌手順を完了させた。

【0036】

4. レーザードップラー画像化

レーザードップラーイメージャー (LDI) を使用して、手術後 2 週間に亘って連続的血流測定を記録した。LDI システム (Moore Instruments Ltd.、英国デボン) には、 $12\times 12\text{cm}$ の組織表面を $600\mu\text{m}$ の深さまで連続的に走査する光線が発生させるために 2mW のヘリウム-ネオンレーザーが組み込まれている。走査中に、血管系を移動する血球はドップラー原理に従って投射光の振動数を変化させる。フォトダイオードは逆方向の散乱光を集めるので、元の光強度の変動は 0~10V の範囲の電圧変動に転換される。0V の灌流出力値を 0% の灌流に目盛り付けし、一方 10V を 100% の灌流に目盛り付けした。走査が終了しそして逆方向の散乱光が全ての測定部位から集められると、血流分布を示す色分けされた画像がテレビモニターに表示される。灌流シグナルは 6 つの異なる区分に分けられ、そして各々は別個の色として表示される。血流量低下又は灌流無しは暗青色として示され、一方最大灌流は赤色として表示される。

【0037】

LDI を使用して、閉塞前、直後、7 日目及び 14 日目の脳表面の灌流を記録した。頭皮中線切開部を通して、電気ドリルで $12\times 12\text{mm}$ の骨窓を作った。この骨窓

上で連続的測定値が得られた。色分けされた画像が記録され、そして分析は各ラットについて灌流平均値を計算して実施した。周辺光や温度を含む変数を考慮するために、灌流計算値は後（虚血）対前（非処置）の脳の比として表した。

【0038】

5. 組織病理学的検査

3%のバラホルムアルデヒド/20%のショ糖溶液中で1日間固定した後に、X-gal染色用に、25 μ mの冠状面冷凍切片を100 μ mごとに作製した。切片をX-galで染色して β -ガラクトシダーゼを発現している染色されたニューロンを同定した。アルカリホスファターゼ（ALP）染色用に、25 μ mの冠状面冷凍切片を100 μ mごとに作製した。これらの切片を0.3%の過酸化水素を含有するPBSと共にインキュベートして、内因性ペルオキシダーゼ活性を下げ、そしてその後、10%のウマ血清を有するPBS中で希釈した一次抗体又はレクチンと共に室温で60分間インキュベートした。2%のウマ血清を含有するトリス緩衝生理食塩液中で3回洗浄した後、種に適するビオチン付加二次抗体、続いてアビジン-ビオチンペルオキシダーゼコンプレックス（Vectastain ABC kit, PK 6100, Vector Laboratories、カリフォルニア州バーリングヘム）をインキュベートした。抗体結合はジアミノベンジジンを使用して視覚化した。一次抗体を省略し、そしてタイプ及びクラスに適合した無関係な免疫グロブリンで染色して各抗体の陰性対照として使用した。

【0039】

6. 脳脊髄液（CSF）中のHGF及びVEGFに対するELISA法

両側頸動脈の閉塞前並びに7及び14日後のラットから得られたCSF（100 μ l）をこれらの実験用に使用した。ラット及びヒトHGFはELISAキット（Institute of Immunology、東京都）で測定し、そしてヒトVEGFもELISAキット（R&D systems、ミネソタ州ミネアポリス）で測定した。

【0040】

7. 実験材料

ヒトHGF遺伝子は、ヒトのHGFのcDNA（特許第2777678号）を常法によりクローニングし、これを発現ベクターpcDNA（インビトロゲン社製）に

挿入したものを用了。

ヒト VEGF 遺伝子は、ヒト VEGF 165 の cDNA (Science 246,1306(1989)) を常法によりクローニングし、これを発現ベクター pUC-CAGGS に挿入したものを用了。

ヒト組換え HGF は、ヒト HGF cDNA (特許第 2777678 号) を発現ベクター p cDNA (インビトロゲン社製) に挿入した組換え発現ベクターでチャイニズハムスター卵巣細胞 (ATCC) 又は C-127 細胞 (ATCC) をトランスフェクションした後、その培養培地から常法により精製したものを用了。

【0041】

上記の材料及び実験方法に基づき、以下の実施例を行った。

【0042】

実施例 1

インビボでの β -ガラクトシダーゼ遺伝子のトランスフェクションにおける HV J-リボソーム送達系の効果

導入する遺伝子として β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (インビトロゲン社製、HV J リボソーム中の濃度: $20 \mu\text{g/ml}$) を使用し、上記の材料及び実験方法の記載に従って HV J-リボソームを調製した。

まず、HV J-リボソームコンプレックスをラットの内頸動脈に直接注入して、脳に到達させた。しかしながら、上記頸動脈での動脈内注入では、注入後 3 及び 7 日目に脳又は微小血管内皮細胞での発現は殆ど生じなかった (データは示していない)。それ故、HV J-リボソームを側脳室及びクモ膜下腔に注入することとした。HV J-リボソーム法による β -ガラクトシダーゼ遺伝子の注入はどちらも注入後 3 及び 7 日目に β -gal の顕著な発現を生じさせた (図 1 及び図 2)。側脳に注入したとき、 β -gal 発現は主として側脳室及び脈絡膜叢周辺に観察された。対照的に、大槽に注入したとき、 β -gal 発現は脳表面に観察された。以上の結果より、脳の血流量低下を血管新生で治療しようとするとき、クモ膜下腔への注入を使用することがより良好であることが明らかとなった。

【0043】

実施例 2

HGF及びVEGF遺伝子のインビボトランスフェクション

HGFやVEGF遺伝子の遺伝子導入の効果を知らるために、エリザ法で脳脊髄液（CSF）中でのこれら分子のタンパク質発現を測定した（ $n=4$ 、各群）。最初に両側頸動脈の閉塞前、7日後及び14日後に対照ラット（HGFやVEGF遺伝子挿入のない発現ベクターで処置）のCSF中のヒトHGF及びVEGFを測定したが、これらのタンパク質の濃度は検出されなかった（図3及び図4）。

【0044】

次に、HGF遺伝子（HVJリポソーム中の濃度： $20\mu\text{g/ml}$ ）を頸動脈閉塞直後にクモ膜下腔に導入したラットのCSF中のヒトHGFタンパク質濃度を測定した。トランスフェクション後7日目に、ヒトHGFが検出されたが、ラットHGFは検出されなかった（図3）。頸動脈を閉塞されていないラット（ $1.63\pm 0.16\text{ng/ml}$ ）と頸動脈を閉塞されたラット（ $1.67\pm 0.29\text{ng/ml}$ ）間で顕著な差異はなかった。トランスフェクション後14日目でさえ、ヒトHGFが（ $0.40\pm 0.04\text{ng/ml}$ ）で検出された（図3）。

【0045】

上記のHGF遺伝子と同様の手法により、VEGF遺伝子（HVJリポソーム中の濃度： $20\mu\text{g/ml}$ ）をクモ膜下腔に導入したところ、CSF中のヒトVEGFの濃度はHGFよりはるかに低かった（図4）（7日目；頸動脈を閉塞されていないラットで $18.9\pm 2.9\text{pg/ml}$ 、頸動脈を閉塞されたラットで $16.8\pm 5.8\text{pg/ml}$ 、14日目；頸動脈を閉塞されていないラットで $11.7\pm 1.6\text{pg/ml}$ 、頸動脈を閉塞されたラットで $9.9\pm 1.5\text{pg/ml}$ ）。これらの間のこの差異の理由は不明であるが、慢性の血流量低下を治療するためにはHGFを適用して血管新生を生じさせることがより良好であるように思われる。

【0046】

実施例3

HGFトランスフェクションによる脳表面での血管新生

実施例2と同様の処置を施したラットの組織を用いて、CNSにおけるHGF遺伝子導入の血管新生効果を確認した。すなわち、血管内皮細胞を検出するアルカリホスファターゼ（ALP）染色を使用した組織病理学的分析を実施して、脳

内及び周辺の内皮細胞を検出した。HGF遺伝子導入されていないラットでは、ALP陽性細胞は両側頸動脈の閉塞前及び7日後の脳の内部に限定されていた（図5のA、C）。興味深いことにHGF遺伝子導入ラットでは、ALP陽性細胞は脳表面に観察され、両側頸動脈を閉塞されていないラットより閉塞されたラットでより多く脳表面に観察された（図5のB、D）。従ってこれらの結果は、HGF遺伝子導入によって、特に虚血状態の脳表面に血管新生が生じるものと考えられた。

【0047】

実施例4

LDIで測定したラットの脳血流（CBF）

両側頸動脈閉塞前後のラットのCBFを測定した。最初に、閉塞前、直後、7日後及び14日後に遺伝子を導入されていないラットのCBFの変化を分析した。予期されたように、CBFは両側頸動脈の閉塞直後に減少し、そして時間依存的に徐々に増加した（図6）。しかしながら、CBFは非処置ラットと比較して閉塞後7及び14日目にやはり顕著により低かった（図6）。

【0048】

次に、組換えHGF（200 μ g）、HGF遺伝子（HVJリポソーム中の濃度：20 μ g/ml）、及び組換えHGFとHGF遺伝子の組合せ物で処置したラットを測定した。これらHGF遺伝子及び組換えHGFは、実施例2および3と同じくクモ膜下腔に注入した。各処置は頸動脈閉塞の10分後に実施した。組換えHGFで処置したラットでは、対照ラットと比較してCBFの顕著な増加はなかった（対照：886.1 \pm 99.6、組換えHGF；985.5 \pm 142.4）（図7）。しかしながら、HGF遺伝子導入による処置では閉塞後7日目にCBFが顕著に増加した（1214.5 \pm 145.1）。更に、組換えHGFと遺伝子導入を組合せて処置したラットでは、予想外に、CBFは遺伝子導入単独の場合と比較して7日目にはるかに高かった（1490.3 \pm 197.9）。これらの結果より、HGF遺伝子導入による血管新生が脳の慢性的な血流量低下を改善し、そして動脈閉塞後に処置したとき、遺伝子と組換えHGFの組合せが最も効果的であることが示された。

他方、VEGF遺伝子導入もCBFを増加させたことから（1122.8 \pm 265.3）

(図7)、VEGF遺伝子も脳の血流量低下の改善に有用であることが明らかとなった。

【0049】

次に、動脈閉塞前に実施したとき、この処置が有効であり得るかどうかを検討した。興味深いことに、HGF又はVEGF遺伝子で動脈閉塞前に処置すると頸動脈閉塞によるCBFの減少を防止した(対照: 459.4 ± 87.4 、HGF: 796.8 ± 204 、VEGF: 737.6 ± 211.5) (図8)。これらの結果は、虚血前に送達されたとき、HGFとVEGF遺伝子導入が動脈閉塞による血流量低下を防止(予防)するのに有効であることを示している。

【0050】

【発明の効果】

本発明により、HGF遺伝子及び／又はVEGF遺伝子を有効成分として含有する脳血管障害の治療又は予防剤、あるいは当該治療又は予防剤をクモ膜下腔に投与することを特徴とする新規な投与方法などを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、脳表面の β -gal (β -ガラクトシダーゼ)の発現を示す生物の形態写真の模写図である。左、HVJ-リポソーム(1ml)の内頸動脈内注入；中、HVJ-リポソーム(100 μ l)の大槽(クモ膜下腔)内注入；右、HVJ-リポソーム(20 μ l)の側脳室注入。各群、n=4。

【図2】

図2は、脳内の β -gal (β -ガラクトシダーゼ)の発現を示す生物の形態写真の模写図である。上、内頸動脈内注入；中、側脳室注入；下、大槽(クモ膜下腔)内注入。

【図3】

図3は、エリザ法によるラット脳脊髄液中でのヒトHGFのインビボタンパク質発現を示すグラフである。図中、UTはHGF遺伝子を含まない発現ベクターで処置したラットを、7dはHGF遺伝子導入7日目のラットを、14dはHGF遺伝子導入14日目のラットを示す。また図中、-は頸動脈の閉塞無しを、ま

た+は閉塞有りを示す。縦軸はHGFの濃度 (ng/ml) を示す。 **: UT に対して $P < 0.01$ 。各群、 $n = 4$ 。

【図4】

図4は、エリザ法によるラット脳脊髄液中でのヒトVEGFのインビボタンパク質発現を示すグラフである。図中、UTはVEGF遺伝子を含まない発現ベクターで処置したラットを、7dはVEGF遺伝子導入7日目のラットを、14dはVEGF遺伝子導入14日目のラットを示す。また図中、-は頸動脈の閉塞無しを、また+は閉塞有りを示す。縦軸はVEGFの濃度 (pg/ml) を示す。 **: UT に対して $P < 0.01$ 。各群、 $n = 4$ 。

【図5】

図5は、HGF遺伝子のトランスフェクション前及び7日後の脳内及び周辺の内皮細胞に対する細胞組織化学的染色の結果を示す顕微鏡写真の模写図である。A (上左)、頸動脈を閉塞しないでベクター (HGF遺伝子を含まない発現ベクター) をトランスフェクションした脳; B (上右)、頸動脈を閉塞しないでHGF遺伝子をトランスフェクションした脳; C (下左)、頸動脈閉塞後7日目のベクターをトランスフェクションした脳; D (下右)、頸動脈閉塞後7日目のHGF遺伝子をトランスフェクションした脳。各群、 $n = 4$ 。

【図6】

図6は、レーザードップラーイメージャー (LDI) で測定した脳血流の時間経過を示すグラフである。図中、preは閉塞前を、postは頸動脈閉塞直後を、7dは閉塞7日後を、14dは閉塞14日後の結果を示す。縦軸 (FLUX) は脳灌流平均値を示す。preに対して、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。各群、 $n = 6$ 。

【図7】

図7は、頸動脈閉塞後7日目にLDIで測定したCBFを示すグラフである。図中、UTは発現ベクターで処置したラットを、RCは組換えHGF (200 μ g) で処置したラットを、GENEはHGF遺伝子 (10 μ g) で処置したラットを、GENE & RCは組換えHGF (200 μ g) とHGF遺伝子 (10 μ g) で処置したラットを、またVEGFにおけるGENEはVEGF遺伝子 (20 μ g/ml) で処置したラットの結果を示す。また縦軸 (FLUX) は脳灌流平均値を示す。U

Tに対して、 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 。各群、 $n=6$ 。

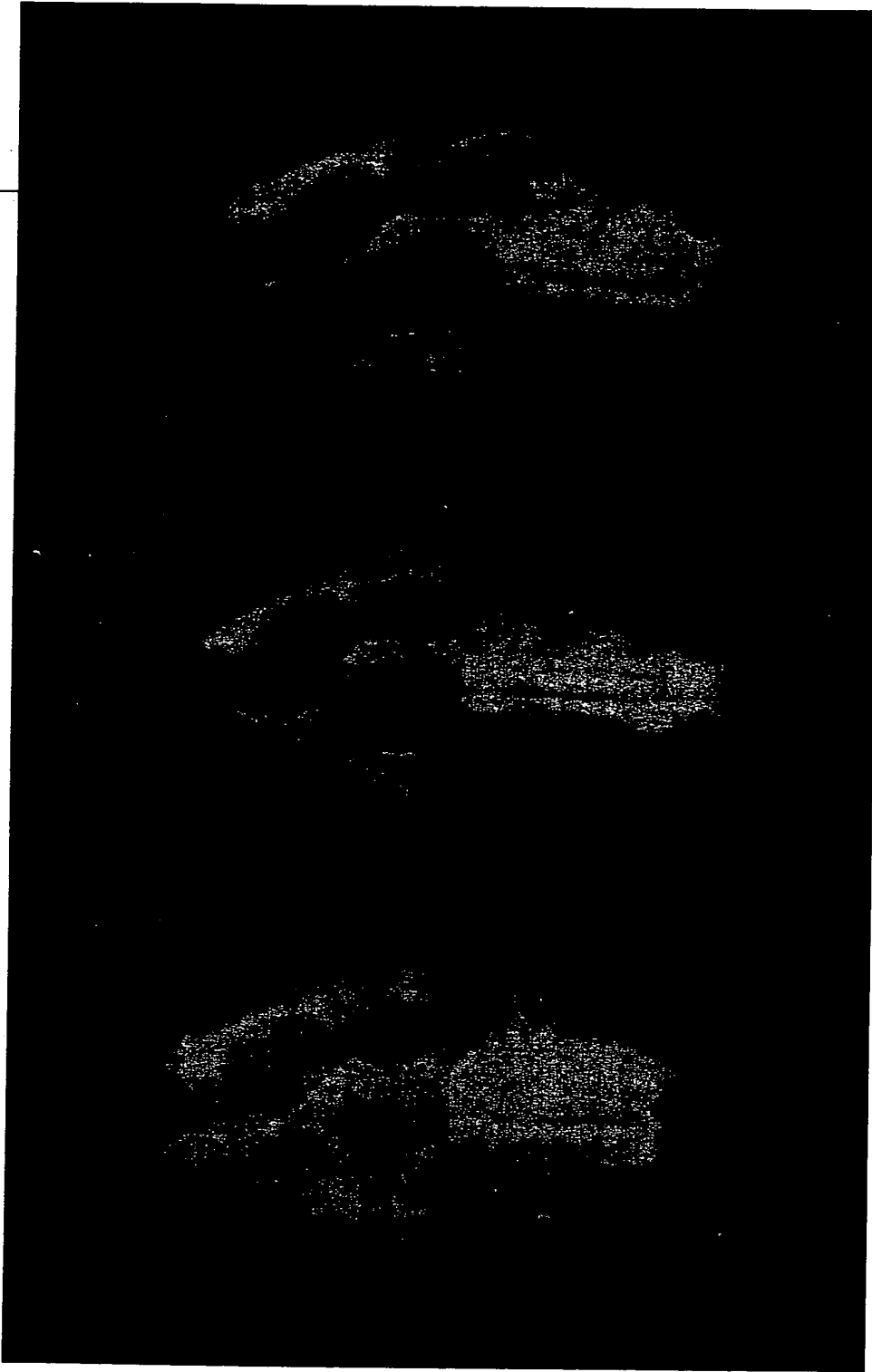
【図8】

図8は、頸動脈の閉塞前及び直後にLDIで測定したCBFを示すグラフである。図中preは、対照ラットの頸動脈閉塞前を、postは対照ラットの頸動脈閉塞直後を、HGFは動脈閉塞7日前にHGFトランスフェクションを行ったラットの頸動脈閉塞直後の結果を、VEGFは動脈閉塞7日前にVEGFトランスフェクションを行ったラットの頸動脈閉塞直後の結果を示す。postに対して、 $**P<0.01$ 。各群、 $n=5$ 。

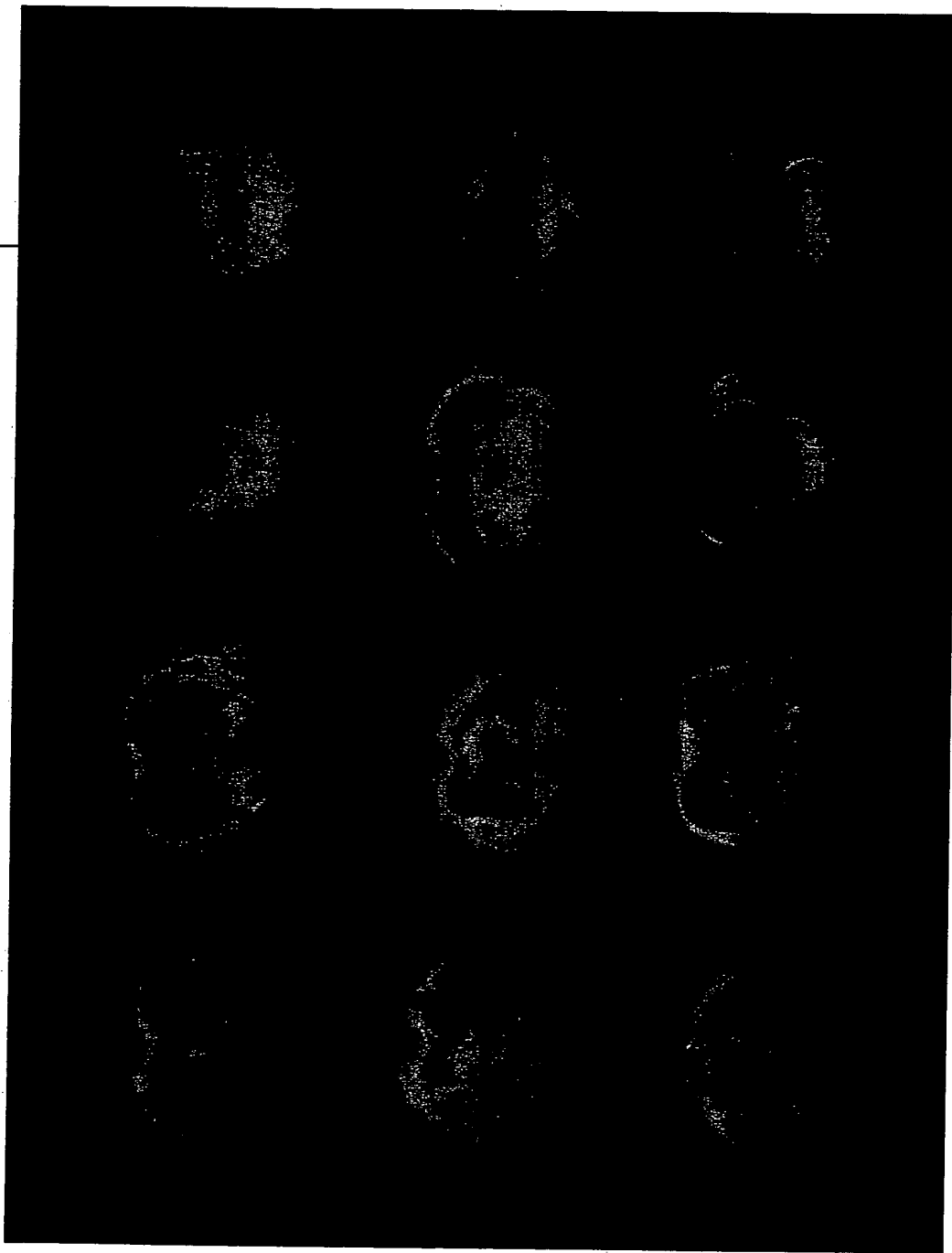
【書類名】

図面

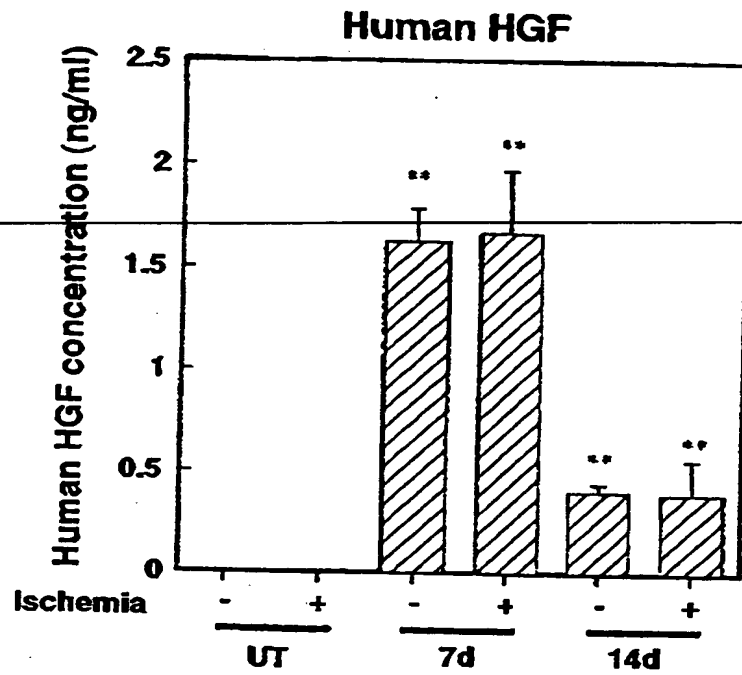
【図1】



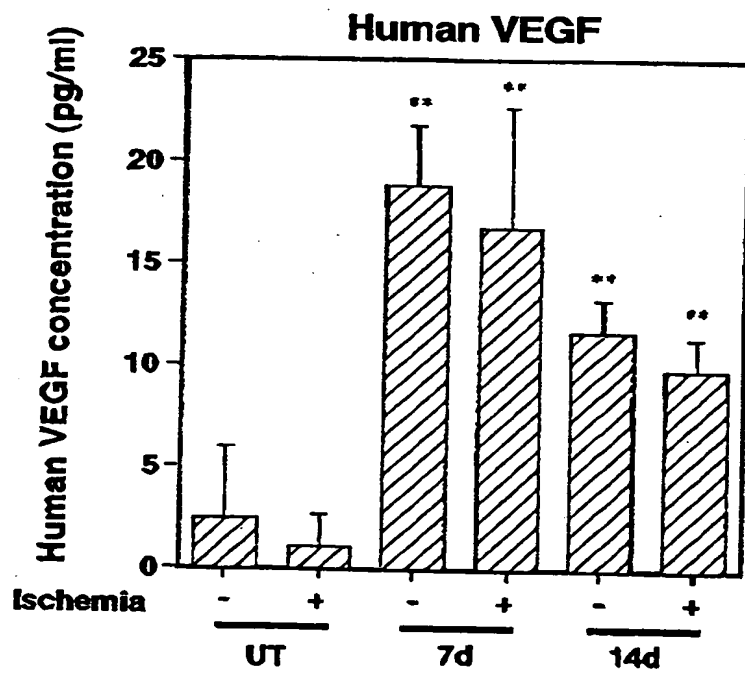
【図2】



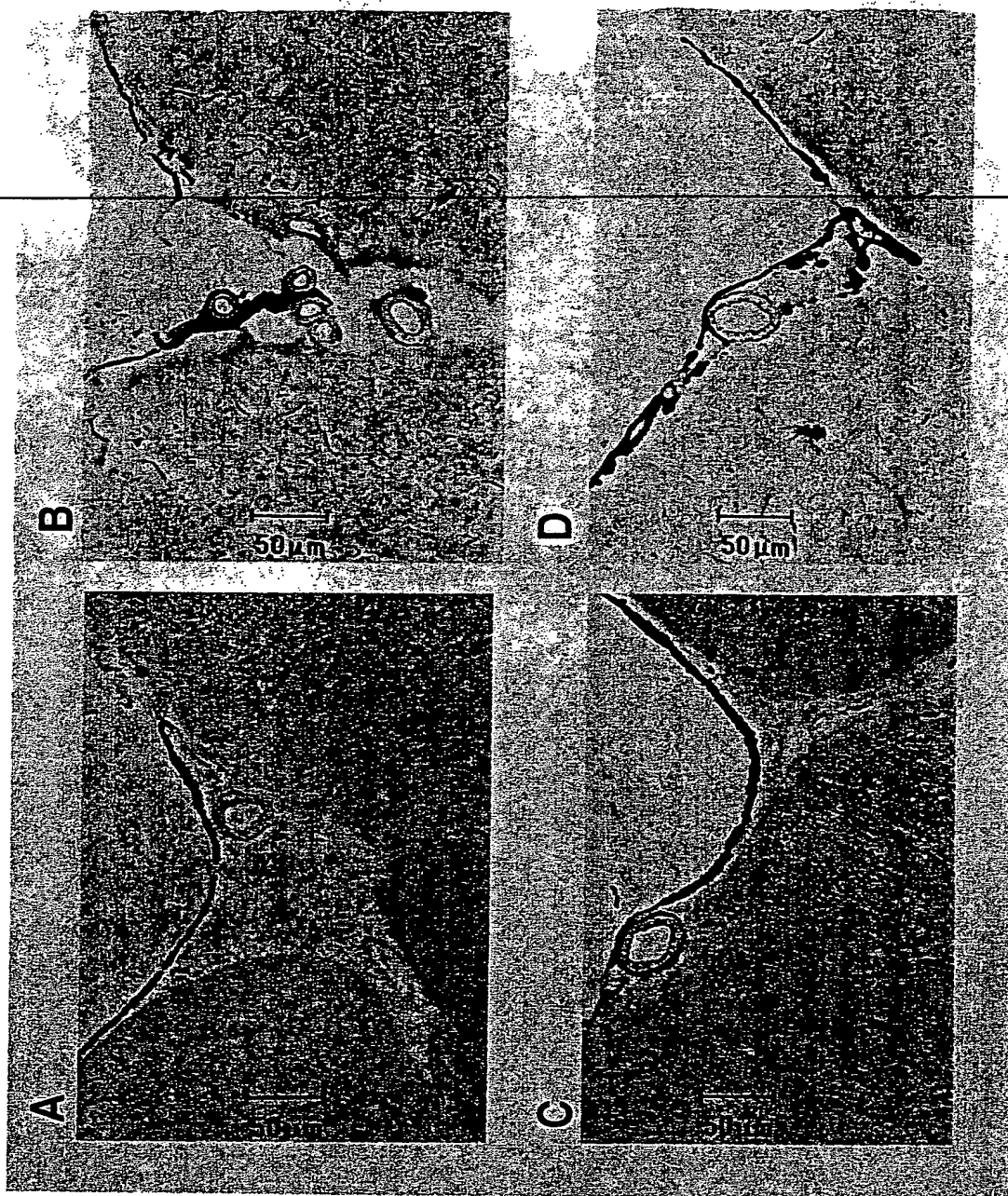
【図 3】



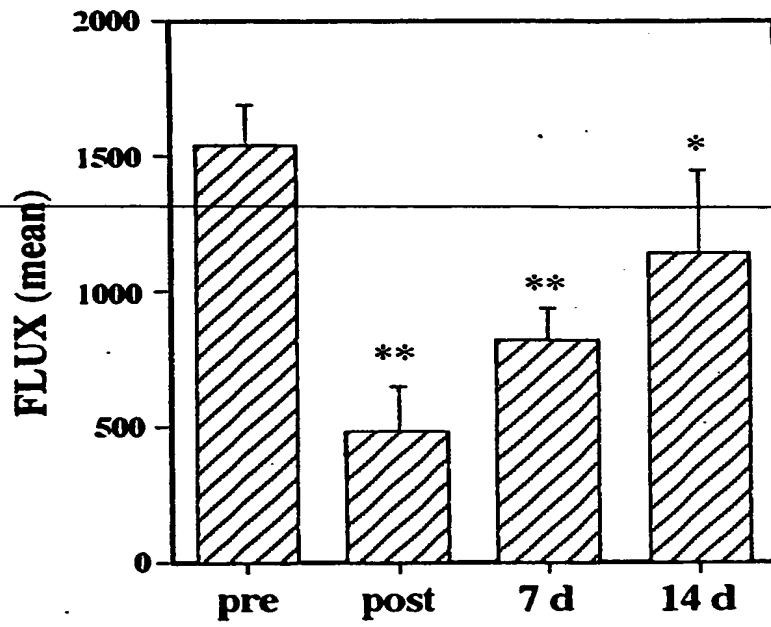
【図 4】



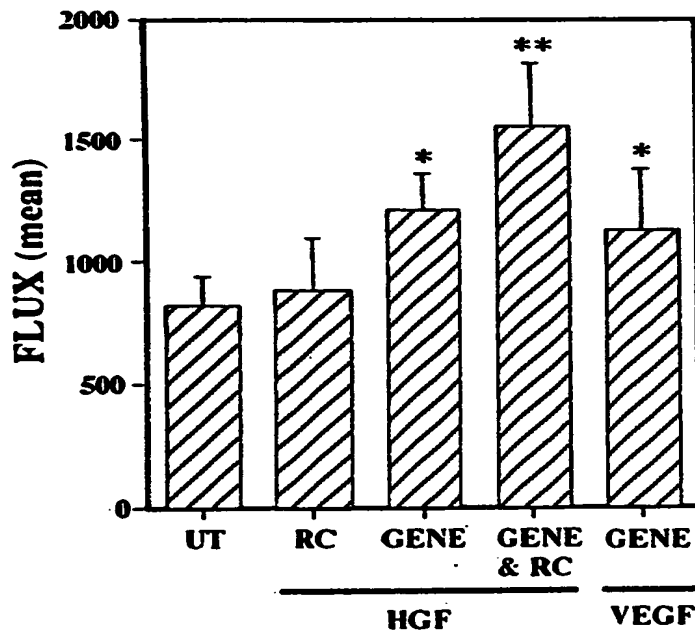
【図 5】



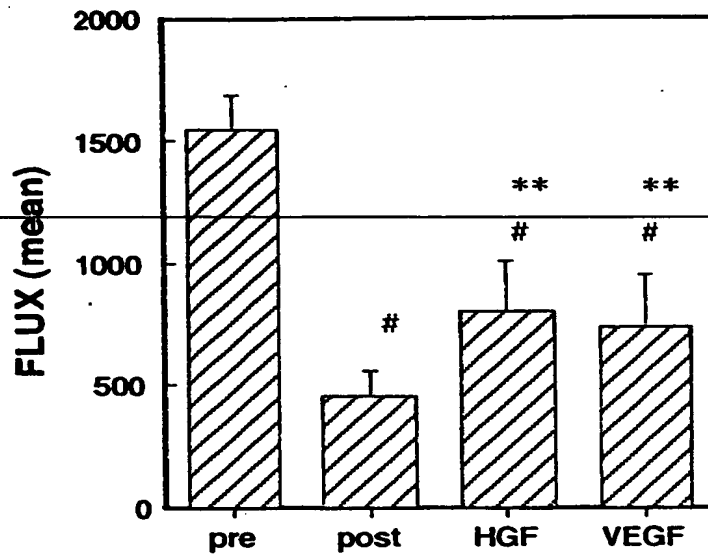
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脳血管障害を治療又は予防するための新規な遺伝子治療剤、および当該遺伝子治療剤の新規な投与方法を提供すること。

【解決手段】 HGF（肝実質細胞増殖因子）遺伝子及び／又は VEGF（血管内皮増殖因子）遺伝子を有効成分として含有する、脳血管閉塞、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、脳卒中、脳出血、もやもや病、脳血管性痴呆、アルツハイマー型痴呆等の脳血管障害の治療又は予防剤、あるいは当該治療又は予防剤をクモ膜下腔に投与することを特徴とする新規な投与方法など。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第267024号
受付番号	59900916620
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年10月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成11年 9月21日

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000183370]

1. 変更年月日	1990年 8月 9日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
氏 名	住友製薬株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[595068287]

1. 変更年月日	1995年 5月12日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502
氏 名	森下 竜一

THIS PAGE BLANK (USPTO)